

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/002660

International filing date: 14 February 2005 (14.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-035678  
Filing date: 12 February 2004 (12.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 31 March 2005 (31.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

14. 2. 2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 4 年    2 月 1 2 日  
Date of Application:

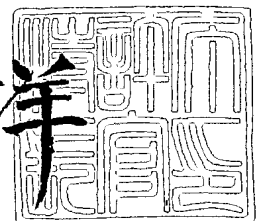
出 願 番 号      特 願 2 0 0 4 - 0 3 5 6 7 8  
Application Number:  
[ST. 10/C]:      [ J P 2 0 0 4 - 0 3 5 6 7 8 ]

出      願      人      独 立 行 政 法 人 科 学 技 術 振 興 機 構  
Applicant(s):

2 0 0 5 年    3 月 1 8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願  
【整理番号】 NP03500-SH  
【提出日】 平成16年 2月12日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 G01N 33/53  
G01N 33/566

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都新宿区市ヶ谷薬王寺町 4 5 - 1 - 2 0 3  
【氏名】 梅澤 喜夫

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都文京区向丘 2 - 8 - 4 - 7 0 1  
【氏名】 佐藤 守俊

【特許出願人】  
【識別番号】 503360115  
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構

【代理人】  
【識別番号】 100093230  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 西澤 利夫  
【電話番号】 03-5778-0201

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 009911  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0316415

**【書類名】特許請求の範囲****【請求項 1】**

少なくとも、核内レセプターのリガンド結合ドメインを含むリガンド認識部位と、該核内レセプターリガンド結合ドメインにおける活性化補助因子結合ドメインに特異的に結合するペプチド鎖を含む結合応答部位が、屈曲性のリンカーを介して連結されており、この「リガンド認識部位／リンカー／結合応答部位」融合構造の両末端に、互いの接近が検出可能な二つのマーカー部位が各々連結されていることを特徴とする核内レセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ。

**【請求項 2】**

リガンド認識部位は、グルココルチコイドレセプター、エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプター、アンドロゲンレセプター、甲状腺ホルモンレセプター、レチノイン酸レセプター、ビタミンDレセプター、およびオーファンレセプターからなる群より選択されるいずれかの核内レセプターのリガンド結合ドメインを含むものである請求項 1 のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ。

**【請求項 3】**

リガンド認識部位は、エストロゲンレセプター  $\alpha$  リガンド結合ドメインである請求項 1 のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ。

**【請求項 4】**

結合応答部位は、ステロイドレセプター活性化補助因子 1 の核内レセプター相互作用ドメインペプチドである請求項 3 のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ。

**【請求項 5】**

結合応答部位は、配列番号 1 のモチーフを含むものである請求項 3 のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ。

**【請求項 6】**

互いの接近が検出可能な二つのマーカー部位は、黄色蛍光タンパク質とシアン蛍光タンパク質である請求項 1 ないし 5 のいずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ。

**【請求項 7】**

核内レセプターに対するアゴニストをスクリーニングするための方法であって、請求項 1 ないし 6 のいずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブとアゴニスト候補物質を共存させ、アゴニスト候補物質非存在下および存在下におけるシグナルの変化を測定するアゴニストのスクリーニング方法。

**【請求項 8】**

請求項 1 ないし 6 のいずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、細胞内で該プローブとアゴニスト候補物質を共存させる請求項 7 のアゴニストのスクリーニング方法。

**【請求項 9】**

請求項 1 ないし 6 のいずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞において、該プローブとアゴニスト候補物質を共存させる請求項 7 のアゴニストのスクリーニング方法。

**【請求項 10】**

核内レセプターに結合し、拮抗作用を示すアンタゴニストをスクリーニングするための方法であって、既知のアゴニストの存在下で、請求項 1 ないし 6 のいずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブと過剰量のアンタゴニスト候補物質を共存させ、アンタゴニスト候補物質非存在下および存在下におけるシグナルの変化を測定するアンタゴニストのスクリーニング方法。

**【請求項 11】**

請求項 1 ないし 6 のいずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、細胞内で、該プローブと既知のアゴニストとアンタゴニスト候補物質を共存させる請求項 10 のアンタゴニストのスクリーニング方法。

**【請求項 12】**

請求項 1 ないし 6 のいずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞において、該プローブと既知のアゴニストとアンタゴニスト候補物質を共存させる請求項 10 のアンタゴニストのスクリーニング方法。

**【請求項 13】**

請求項 1 ないし 6 のいずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって得られる非ヒト動物またはその子孫動物。

**【書類名】 明細書**

**【発明の名称】** 核内レセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブとそれを用いた核内レセプターに対するアゴニストおよびアンタゴニストのスクリーニング方法

**【技術分野】****【0001】**

この出願の発明は、核内レセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブに関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、核内レセプターに対するアゴニストとアンタゴニストを選択性高く検出、定量するためプローブと、それを用いた核内レセプターに対するアゴニストおよび／またはアンタゴニストのスクリーニング方法に関するものである。

**【背景技術】****【0002】**

エストロゲン、プロゲステロン、アンドロゲン、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイドなどのステロイドホルモンや、甲状腺ホルモン、レチノイン酸等の脂溶性シグナル分子は、標的組織（細胞）の増殖・分化の制御、個体発生、精神活動等、高等動物の生命活動全般に深く関わるとともに、多くの疾患の発症や悪化にも関与していることが明らかになっている。また、核内には、これらの脂溶性シグナル分子に対する特異的なレセプターが存在することが知られており、これらのレセプター群は核内レセプターと総称され、一つの遺伝子スーパーファミリーを形成している。

**【0003】**

このような核内レセプターは、リガンド依存性転写因子であり、前記の脂溶性シグナル分子と特異的に結合し、標的遺伝子のプロモーター上の応答配列を認識して結合することにより転写促進作用を発揮することが知られている。

**【0004】**

また、最近の核内レセプターの研究により、核内レセプターの転写制御機構においてはリガンドだけでなく、転写を各々正負に制御する活性化補助因子の機能が重要な役割を果たすことが明らかになっている。

**【0005】**

例えば、多くの生殖組織の成長、発達、維持の原因となるエストロゲンは（非特許文献1）、エストロゲンレセプター（ER）に結合することにより、生理学的ならびに薬理学的効果を発揮する（非特許文献2および3）。一方、ステロイドレセプター活性化補助因子1（SRC-1）はp160核内ホルモンレセプター活性化補助因子ファミリーに属し、ERがアゴニストと複合体を形成した場合に、ERの活性化補助因子結合ドメインと相互作用してERの転写活性を誘起するようになるが、アゴニストが存在しない場合やERがアンタゴニストと結合している場合にはこのような現象が生じないことが明らかにされている（非特許文献4）。このとき、アゴニストはERの高次構造の変化を誘導し、これによりER上に活性化補助因子結合ドメインが形成され、ERへの活性化補助因子の結合が促進および安定化される。同時にERと活性化補助因子の結合により、ERとアゴニストの結合が相互的に安定化され、アゴニストのERからの解離速度が顕著に低下する（非特許文献5）。

**【0006】**

ところで、従来より、天然エストロゲンに対して構造的類似性をほとんど有さない多くの合成化学物質が、ERと結合し、生体内での天然エストロゲン活性を模倣または阻害する内分泌攪乱物質として作用することが報告されている（非特許文献6～9）。野生動物やヒトが発達の比較的初期にこのようなエストロゲン性化学物質に曝露された場合には、生殖器官の異常、生殖器重量の減少、精子の数的減少や質低下が生じることが知られている（非特許文献10～12）。同様に、エストロゲン以外の脂溶性シグナル分子に関しても、内分泌攪乱物質の存在や影響が明らかにされている。

**【0007】**

そこで、ERに対する物質の結合性を試験する方法について多くの研究が進められている（非特許文献7、13～16）が、これら従来の結合試験方法は、いずれも競合反応に基

づくものであり、通常、試験物質がERに結合された標識リガンド（一般的には、放射性 $^{17}\beta$  エストラジオール（E2））を置換するものである。このような方法では、内分泌攪乱物質の大規模なスクリーニングが可能であるが、例えば、アンタゴニストの場合のように、レセプターに対する物質の結合が必ずしも転写活性を起こすとは限らないため、試験物質がアゴニストとして作用するのか、アンタゴニストとして作用するのかを区別できないという問題があった。

#### 【0008】

また、これら従来の試験方法は、水溶性の低い物質の結合親和性を調べるには不向きであるという問題もあった。さらに、生理学的条件より低い温度でのインキュベーションが必要である上、測定前に数回の洗浄を行うことにより遊離の放射性標識分子を除去する必要があり、これらの操作によってERとリガンドの反応平衡が乱される場合があるという問題もあった。

#### 【0009】

最近になって蛍光偏光結合アッセイ（非特許文献17）、電気化学的結合アッセイ（非特許文献18）、表面プラズモン共鳴バイオセンサー技術（非特許文献19）などの放射性同位元素を使用しない新しいin vitro結合アッセイ法も提案されているが、これらもエストロゲンに対するアゴニストとアンタゴニストを区別できない。また、レセプター結合アッセイは大量の精製レセプター蛋白質を必要とする。

#### 【0010】

さらに、化学物質のエストロゲン感受性細胞に対する増殖刺激能力を分析する細胞増殖アッセイとして、MCF-7細胞やT47D細胞を用いるE-スクリーニング法が知られている（非特許文献20）。また、ある化学物質による細胞培養中のレポーター遺伝子作成物に対する転写刺激能を分析する手法としては、酵母や哺乳類細胞を対象とするレポーター遺伝子アッセイ（非特許文献21、22）が、エストロゲン活性を有する物質を特定するための非常に有用な方法として知られている。これらE-スクリーニング法とレポーター遺伝子アッセイ法では、アゴニストとアンタゴニストを区別することができるが、哺乳類細胞や酵母を含む培地にリガンドを添加してから結果を得るまでに約1日かかるという問題があった。

#### 【0011】

したがって、エストロゲンを初めとする核内レセプターに対するアゴニストやアンタゴニストを高速で、選択性高くスクリーニングできる簡便な方法は知られていなかったのが実情である。

【特許文献1】特願 2 0 0 3 - 1 4 5 4 6 6

【特許文献2】特願 2 0 0 3 - 3 0 1 2 5 9

【非特許文献1】Ciocca, D. R. and Roig, L. M. V. Endocr. Rev. 1995, 16, 35-62.

【非特許文献2】Tsai, M. J. and O' Malley, B. W. Annu. Rev. Biochem. 1994, 63, 451-486.

【非特許文献3】Nilsson, S. et al. Physiological Rev. 2001, 81, 1535-1565.

【非特許文献4】McKenna, N. J. et al. Endocr. Rev. 1999, 20, 321-344.

【非特許文献5】Gee, A. C. et al. Mol. Endocrinol. 1999, 13, 1912-1923.

【非特許文献6】Korach, K. S. Endocrinology 1993, 132, 2277-2278.

【非特許文献7】Shelby, M. D. et al. Environ. Health Perspect. 1996, 104, 1296-1300.

【非特許文献8】Oosterkamp, A. J. et al. Anal. Chem. 1997, 69, 545-553.

【非特許文献9】Sonnenschein, C.; Soto, A. M. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 1998, 65, 143-150.

【非特許文献10】Colborn T. Environ. Health Perspect. 1995, 103, 135-136.

【非特許文献11】Neubert, D., Regul. Toxicol. Pharmacol. 1997, 26, 9-29.

【非特許文献12】Daston, G. P. et al. Reprod. Toxicol. 1997, 11, 465-481.

- 【非特許文献 1 3】Salomonsson, M. et al. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 1994, 50, 313-318.
- 【非特許文献 1 4】Kuiper, G. G. J. M. et al. Endocrinology 1997, 138, 863-870.
- 【非特許文献 1 5】Tabira, T. et al. Eur. J. Biochem. 1999, 262, 240-245.
- 【非特許文献 1 6】Blair, R. M. et al. Toxicol. Sci. 2000, 54, 138-155.
- 【非特許文献 1 7】Bolger, R. et al. Environ. Health Perspect. 1998, 106, 551-557.
- 【非特許文献 1 8】Kuramitz, H. et al. Anal. Chem. 2002, 74, 533-538.
- 【非特許文献 1 9】Usami, M. et al. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2002, 81, 47-55.
- 【非特許文献 2 0】Soto, A. M. et al. Environ. Health Perspect. 1995, 103 (Suppl. 7), 113-122.
- 【非特許文献 2 1】Bronstein, I. et al. J. Anal. Biochem. 1994, 219, 169-181.
- 【非特許文献 2 2】Gaido, K. W. et al. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1997, 143, 205-213.
- 【非特許文献 2 3】Herry, D. M. et al. Nature 1997, 387, 733-736.
- 【非特許文献 2 4】Mak, H. Y. et al. Mol. Cell. Biol. 1999, 19, 3895-3903.
- 【非特許文献 2 5】Weatherman, R. V. et al. Mol Endocrinol. 2002, 16, 487-496.
- 【非特許文献 2 6】Ueda H. et al. J. Immunol Methods. 2003, 279 (1-2), 209-18.
- 【非特許文献 2 7】Pollock, B. A.; Heim, R. Cell Biol, 1999, 9, 57-60.
- 【非特許文献 2 8】Mochizuki, N. et al. Nature 2001, 411, 1065-1068.
- 【非特許文献 2 9】Sato M. et al. Nature Biotech. 2002, 20, 287-294.
- 【非特許文献 3 0】Sasaki, K. et al. J. Biol. Chem. 2003, 278, 30945-30951.
- 【非特許文献 3 1】Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77; 7380-7384, 1980
- 【非特許文献 3 2】Brzozowski, A. M. et al. Nature 1997, 389, 753-758.
- 【非特許文献 3 3】Shiau, A. K. et al. Cell 1998, 95, 927-937.
- 【非特許文献 3 4】Routledge, E. J. et al. J. Biol. Chem. 2000, 275, 35986-35993.
- 【非特許文献 3 5】Fang, H. et al. Chem. Res. Toxicol. 2001, 14, 280-294.
- 【非特許文献 3 6】Jordan, V. C. et al. Cancer Res. 2001, 61, 6619-6623.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 1 2】

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、核内レセプターに対するアゴニストやアンタゴニストを高選択的にスクリーニングするための簡便で精度高い方法を提供することを課題としている。

【課題を解決するための手段】

【0 0 1 3】

この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、第 1 には、少なくとも、核内レセプターのリガンド結合ドメインを含むリガンド認識部位と、該核内レセプターリガンド結合ドメインにおける活性化補助因子結合ドメインに特異的に結合するペプチド鎖を含む結合応答部位が、屈曲性のリンカーを介して連結されており、この「リガンド認識部位／リンカー／結合応答部位」融合構造の両末端に、互いの接近が検出可能な二つのマーカー部位が各々連結されていることを特徴とする核内レセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを提供する。

【0 0 1 4】



この出願の発明は、また、第2には、リガンド認識部位がグルココルチコイドレセプター、エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプター、アンドロゲンレセプター、甲状腺ホルモンレセプター、レチノイン酸レセプター、ビタミンDレセプター、およびオーファンレセプターからなる群より選択されるいずれかの核内レセプターのリガンド結合ドメインを含むものであるアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを、第3には、リガンド認識部位がエストロゲンレセプター $\alpha$ リガンド結合ドメインであるアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを提供する。

#### 【0015】

さらに、この出願の発明は、第4には、結合応答部位がステロイドレセプター活性化補助因子1の核内レセプター相互作用ドメインペプチドであるアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを、第5には、結合応答部位が配列番号1のモチーフを含むものであるアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを、そして、第6には、互いの接近が検出可能な二つのマーカー部位が黄色蛍光タンパク質とシアン蛍光タンパク質であるアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを提供する。

#### 【0016】

この出願の発明は、第7には、核内レセプターに対するアゴニストをスクリーニングするための方法であって、前記いずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブとアゴニスト候補物質を共存させ、アゴニスト候補物質非存在下および存在下におけるシグナルの変化を測定するアゴニストのスクリーニング方法を、また、第8には、前記いずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、細胞内で該プローブとアゴニスト候補物質を共存させるアゴニストのスクリーニング方法を、第9には、前記いずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞において、該プローブとアゴニスト候補物質を共存させるアゴニストのスクリーニング方法を提供する。

#### 【0017】

また、さらに、この出願の発明は、第10には、核内レセプターに結合し、拮抗作用を示すアンタゴニストをスクリーニングするための方法であって、既知のアゴニストの存在下で、前記いずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブと過剰量のアンタゴニスト候補物質を共存させ、アンタゴニスト候補物質非存在下および存在下におけるシグナルの変化を測定するアンタゴニストのスクリーニング方法を、第11には、前記いずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、細胞内で、該プローブと既知のアゴニストとアンタゴニスト候補物質を共存させるアンタゴニストのスクリーニング方法を、第12には、前記いずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞において、該プローブと既知のアゴニストとアンタゴニスト候補物質を共存させるアンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

#### 【0018】

そして、第13には、この出願の発明は、前記いずれかのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって得られる非ヒト動物またはその子孫動物をも提供する。

#### 【発明の効果】

#### 【0019】

上記第1～6の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブでは、アゴニストが核内レセプターのリガンド結合ドメインに結合した場合には、核内レセプターリガンド結合ドメインの立体構造が変化し、活性化補助因子結合ドメインが形成される。このとき、屈曲性のリンカーを介してリガンド認識部位に連結されている結合応答部位が、この活性化補助因子結合ドメインを認識し、結合する。これにより、融合構造、すなわち[リガンド認識部位/リンカー/結合応答部位]の両末端に連結された二つのマーカー部位が近づ

きシグナルが検出可能となる。一方、このようなアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブでは、核内レセプターのリガンド結合ドメインにアンタゴニストが結合した場合には、核内レセプターリガンド結合ドメインの立体構造変化は起こらず、活性化補助因子結合ドメインも形成されない。そのため、前記融合構造の両末端に連結された二つのマーカ部位は離れたままとなり、検出可能なシグナルを発しない。したがって、このようなアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを使用することにより、該核内レセプターに対するアゴニストやアンタゴニストを選択的に検出、定量できるようになる。また、特定の物質が、該核内レセプターに対するアゴニストとして作用するか、アンタゴニストとして作用するかを、迅速に、精度高く判定することが可能になる。

#### 【0020】

また、前記第7の発明では、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブとアゴニスト候補物質を共存させ、アゴニスト候補物質非存在下および存在下におけるシグナルの変化を測定することにより、簡便に、精度高く該候補物質が核内レセプターに対するアゴニストとして作用するか否かをスクリーニングできる。

#### 【0021】

さらに、前記第8の発明では、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、細胞内で該プローブとアゴニスト候補物質を共存させることにより、候補物質がアゴニストとして作用するか否かを *in vivo* で判別することが可能となる。

#### 【0022】

前記第9の発明では、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物（前記第13の発明）の全細胞において、該プローブとアゴニスト候補物質を共存させることができる。これにより、該候補物質が核内レセプターに対するアゴニストとして作用するか否かを判別できるとともに、この非ヒト動物の生命活動や疾患に対する該物質の影響や効果をモニターすることが可能となる。また、このような非ヒト動物を用いて、核内レセプターの内在性アゴニスト（例えばエストロゲン）が分泌される時期や条件等の生体内動態を可視化分析することも可能となる。

#### 【0023】

さらに、前記第10の発明では、既知のアゴニストの存在下で、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブと、過剰量のアンタゴニスト候補物質を共存させ、アンタゴニスト候補物質非共存下および共存下におけるシグナルの変化を測定することにより、簡便に、精度高く、該候補物質が核内レセプターに対するアンタゴニストとして作用するか否かをスクリーニングできる。

#### 【0024】

また、前記第11の発明では、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、細胞内で、プローブ、既知のアゴニスト、および候補物質を共存させることにより、候補物質がアンタゴニストとして作用するか否かを *in vivo* で判別することが可能となる。

#### 【0025】

さらに、前記第12の発明では、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物（前記第13の発明）の全細胞においてプローブと既知のアゴニストとアンタゴニスト候補物質を共存させることができる。これにより、該候補物質が核内レセプターに対するアンタゴニストとして作用するか否かを判別できると共に、この非ヒト動物の生命活動や疾患に対するアンタゴニスト候補物質の影響や効果をモニターすることも可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0026】

この出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブは、少なくとも、各々異

なる機能を有する 4 つの部位からなるものである。つまり、図 1 に示されるように、このアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) は、少なくとも、

- ・核内レセプターのリガンド結合ドメイン (以下、NR-LBD と記載する) を含むリガンド認識部位 (2) と、

- ・NR-LBD の活性化補助因子結合ドメイン (22) に特異的に結合できるペプチド鎖を含む結合応答部位 (3) と、

- ・リガンド認識部位 (2) と結合応答部位 (3) を連結する屈曲性のリンカー (4) と、

- ・リガンド認識部位 (2) へのアゴニスト (61) の結合により互いが近接した際に、検出可能なシグナルを発する二つのマーカー部位 (51、52) からなるものである。

#### 【0027】

この出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) は、アゴニスト (61) との共存下およびアンタゴニスト (62) との共存下で、各々異なる立体構造をとり、その差異をシグナル変化として検出することのできるものである。

#### 【0028】

アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) がアゴニスト (61) と共存する場合には、アゴニスト (61) がアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) におけるリガンド認識部位 (2) のリガンド結合ポケット (21) を認識し、そこに結合する (図 1 A-a)。このとき、NR-LBD の立体構造が変化し、リガンド認識部位 (2) に活性化補助因子結合ドメイン (22) が形成される。続いて、結合応答部位 (3) が、この活性化補助因子結合ドメイン (22) を認識し、リンカー (4) が屈曲することにより結合応答部位 (3) と活性化補助因子結合ドメイン (22) の結合が起こる (図 1 A-b)。これにより、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) の立体構造が変化し、二つのマーカー部位 (51、52) が近接する。

#### 【0029】

一方、この出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) がアンタゴニスト (62) と共存する場合には、アンタゴニスト (62) は、アゴニスト (61) の場合と同様に、リガンド認識部位 (2) におけるリガンド結合ポケット (21) を認識して結合する (図 1 B)。しかし、このとき、リガンド認識部位 (2) における NR-LBD の立体構造変化は起こらず、活性化補助因子結合ドメイン (22) も形成されない。したがって、結合応答部位 (3) のリガンド認識部位 (2) への結合は起こらず、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) の立体構造も変化しない。すなわち、二つのマーカー部位 (51、52) は離れたままとなる。

#### 【0030】

このようなアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) において、リガンド認識部位 (2) は、とくに限定されない。例えば、グルココルチコイドレセプター、エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプター、アンドロゲンレセプター、甲状腺ホルモンレセプター、レチノイン酸レセプター、ビタミン D レセプター、あるいはリガンドが不明なオーファンレセプター等、各種の核内レセプターのリガンド結合ドメインを含むものが適用できる。したがって、この出願の発明において、リガンド認識部位 (2) とは、核内レセプターのリガンド結合ドメインそのもの、リガンド結合ドメインを含む核内レセプターの部分構造、および核内レセプターそのものを意味する。もちろん、核内レセプターのリガンド結合ドメインは、公知のものだけでなく、新たに明らかになったものであってもよい。

#### 【0031】

この出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) において、リガンド認識部位 (2) とアゴニスト (61) の結合により形成される活性化補助因子結合ドメイン (22) に特異的に結合できる結合応答部位 (3) は、リガンド認識部位 (2) における活性化補助因子結合ドメイン (22) に特異的に結合するペプチド鎖を含むものであればよく、合成および天然のあらゆるペプチド鎖を用いることができる。例えば、エストロゲンレ

セプターに対する活性化補助因子としては、ステロイド受容体活性化補助因子1 (SRC-1) が知られており、SRC-1内部には核内レセプター相互作用ドメインが存在し、これは等間隔に存在するLXXLLモチーフ (配列番号1) またはNRボックスと呼ばれるロイシン豊富なシグネチャーモチーフの保存性コピー3個により構成されている。このようなモチーフは、エストロゲンレセプターに対するSRC-1の相互作用を媒介するために重要であることが知られている (非特許文献5、23~25) ことから、リガンド認識部位 (2) をエストロゲンレセプターのリガンド結合ドメインを含むものとする場合には、このようなモチーフを有するポリペプチドが結合応答部位 (3) として好ましく適用できる。さらに、SRC-1そのものや、SRC-1の活性化補助因子ペプチド (配列番号2) (非特許文献23~25) が例示される。

#### 【0032】

これらリガンド認識部位 (2) と結合応答部位 (3) は、屈曲性のリンカー (4) を介して連結されている。このようなリンカー (4) は、屈曲性を有するものであればよく、その構造や配列はとくに限定されない。例えば、高分子鎖、天然または合成のペプチド鎖が例示される。このようなリンカー (4) により、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) のリガンド認識部位 (2) と結合応答部位 (3) が連結されるとともに、両者が近づいたり離れたりできるようになり、リガンド認識部位 (2) に形成された活性化補助因子結合ドメイン (22) への結合応答部位 (3) の結合・脱離が可能となる。

#### 【0033】

この出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) では、アゴニスト (61) との結合をシグナル発信する部位として、互いの近接が検出可能な二つのマーカー部位 (51、52) が連結されている。このとき、二つのマーカー部位 (51、52) は、リガンド認識部位 (2) と結合応答部位 (3) の結合により生じるアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) の立体構造の変化に应答して、精度高くシグナル変化を示すものでなければならない。このようなシグナル変化を示すものとしては、レニラルシフェラーゼ補完法によるもの (特許文献1)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ補完法によるもの (非特許文献26)、単色蛍光プローブによるもの (特許文献2) などが例示される。生化学の分野においては、一般的に種々の蛍光発色団も用いられるが、立体構造の変化に敏速に应答するものとしては、蛍光共鳴エネルギー移動 (以下、FRET) (非特許文献27~30) の生起により色調に変化を来たすものが知られている。

#### 【0034】

したがって、この出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) においては、分子認識の結果を検出可能とする部位として、互いの近接が検出可能な二つのマーカー部位 (51、52) が、[リガンド認識部位/リンカー/結合応答部位] 融合構造の両末端に一つずつ連結されている。このようなマーカー部位としては、レニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチドを含む発色団と、レニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチドを含む発色団の組み合わせや、 $\beta$ -ガラクトシダーゼのN-末端側のポリペプチドを含むフラグメントと、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの残るC-末端側のポリペプチドを含むフラグメントの組み合わせ、緑色蛍光タンパク質 (GFP) のブルーシフト変異タンパク質であるシアン蛍光タンパク質 (CFP) とGFPのレッドシフト変異タンパク質である黄色蛍光タンパク質 (YFP) の組み合わせ等が例示される。

#### 【0035】

とくに、CFPとYFPの組み合わせによれば、CFPがFRETのドナーとして、YFPがFRETのアクセプターとして作用し、プローブの立体構造の変化に敏速に应答することから、好ましい。このとき、ドナー/アクセプターは、リガンド認識部位 (2) および結合応答部位 (3) のどちらに結合していてもよい。例えば、図2aに示されるように、結合応答部位 (3) のN-末端にCFPを、リガンド認識部位 (2) のC-末端にYFPを連結できる。もちろん、CFPとYFPの連結位置は反対であってもよい。

#### 【0036】

なお、以上のとおりのこの出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (

1) において、マーカー部位 (51、52) は、各々、適当なリンカー (71、72) を介してリガンド認識部位 (2) や結合応答部位 (3) に連結されていてもよいし、直接連結されていてもよい。

#### 【0037】

以上のとおりのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を用いてアゴニスト (61) やアンタゴニスト (62) を検出、定量、およびスクリーニングすることが可能となる。

#### 【0038】

前記のとおり、この出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) をアゴニストと共存させると、アゴニスト (61) がリガンド認識部位 (2) のリガンド結合ポケット (21) を認識し、結合する。これにより、リガンド認識部位 (2) の立体構造に変化が生じ、活性化補助因子結合ドメイン (22) が形成される。すると、リガンド認識部位 (2) に屈曲性リンカー (4) を介して連結された結合応答部位 (3) がこの活性化補助因子結合ドメイン (22) を認識し、結合する。これにより、二つのマーカー部位 (51、52) が近接し、それによりシグナル変化、例えば、発光や蛍光の生起、強度や波長の変化等が生じる。

#### 【0039】

そこで、例えば、患者の体内から採取された試料 (尿、血液など) に、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を添加し、測定を行い、そのシグナル変化を対照 (ブランク) のものと比較すれば、特定の核内レセプターに対するアゴニストが存在するか否かを判断することが可能となる。すなわち、例えば、二つのマーカー部位 (51、52) が前記のCFPとYFPの場合には、ドナーとして作用する発色団 (仮に51とする) に励起波長を照射し、該発色団 (51) の蛍光強度を測定した場合、アゴニストが存在すれば蛍光強度がブランクのそれよりも低下する。逆に、二つの蛍光発色団 (51、52) のうち、ドナーとして作用する発色団 (仮に51とする) に励起波長を照射し、アクセプターとして作用する発色団 (この場合52) の蛍光強度を測定した場合には、蛍光強度はブランクのそれよりも増大する。また、蛍光強度とアゴニスト (61) 量 (濃度) の関係を予め検量することにより、アゴニスト (61) を定量することもできる。

#### 【0040】

さらに、この出願の発明では、前記のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を用いたアゴニストのスクリーニング方法をも提供する。具体的には、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) とアゴニスト候補物質を共存させ、シグナルの変化を測定することにより、アゴニストをスクリーニングすることができる。候補物質がアゴニストとして作用するものであれば、前記のとおり、機構により二つのマーカー部位 (51、52) が近接し、シグナルの変化が見られる。一方、候補物質がアゴニストとして作用しない場合には、このようなシグナルの変化は見られない。

#### 【0041】

また、この出願の発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を用いれば、スクリーニングされた候補物質のアゴニストとしての強度を測定することも可能になる。前記のとおり、アゴニスト (61) がリガンド認識部位 (2) に結合することにより、結合応答部位 (3) と活性化補助因子結合ドメイン (22) の結合が生じるが、このとき、該アゴニスト (61) とリガンド認識部位 (2) の結合力が強い場合には、活性化補助因子結合ドメイン (22) と結合応答部位 (3) の結合が安定化され、その作用により同時にアゴニスト (61) とリガンド認識部位 (2) の結合も安定化する。そのため、アゴニスト (61) のリガンド認識部位 (2) からの解離速度が低下し、反応平衡がアゴニスト結合形成方向にシフトする。したがって、例えば、二つのマーカー部位 (51、52) をCFPとYFPとした前記の例では、アゴニスト (61) 添加時からの蛍光強度の経時変化を測定すれば、蛍光強度変化の増大が観察される。一方、アゴニスト (61) のリガンド認識部位 (2) に対する結合力が弱い場合には、活性化補助因子結合ドメイン (22) と結合応答部位 (3) の結合が十分に安定化されず、その影響でアゴニスト (61) とリガンド認識部位 (2) の結合も

解離し易いものとなる。すなわち、反応平衡が維持されるか、アゴニスト解離方向にシフトする。したがって、前記の例では、アゴニスト (61) 添加時からの蛍光強度の経時変化を測定した場合には、蛍光強度の変化率が一時的に大きくなっても、時間の経過とともに小さくなっていくことが観察される。

#### 【0042】

なお、以上のとおりのアゴニストのスクリーニング方法では、高い測定精度を維持するために、スクリーニングの対照となる候補物質以外にアゴニストやアンタゴニストが存在しないものとするのが望ましい。

#### 【0043】

この出願の発明では、また、前記のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を用いてアンタゴニストをスクリーニングする方法をも提供する。具体的には、内在性アゴニスト等の既知のアゴニストの存在下で、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) と、過剰量のアンタゴニスト候補物質を共存させ、シグナルの変化を測定することによりアンタゴニストをスクリーニングすることができる。このとき、既知のアゴニストとアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) のみが存在する状態では、アゴニストとリガンド認識部位 (2) が結合することにより、二つのマーカー部位 (51、52) が近接し、シグナルが検出される。しかし、過剰量のアンタゴニスト候補物質が共存する場合には、候補物質が拮抗作用を示せばこれがアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) におけるリガンド認識部位 (2) のリガンド結合ドメイン (22) を認識し、選択的に結合するようになる。したがって、このようなシグナルは徐々に減少する。一方、アンタゴニスト候補物質が拮抗作用を示さない場合には、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) におけるアゴニストとリガンド認識部位 (2) との結合が維持され、二つのマーカー部位 (51、52) が近接した状態が持続する。そこで、予めアンタゴニスト候補物質非共存下でのシグナル、例えば蛍光強度を測定し、その結果を過剰量のアンタゴニスト候補物質の共存下での蛍光強度と比較すれば、該候補物質がアンタゴニストとして作用するかが正確に判断できる。

#### 【0044】

具体的には、二つのマーカー部位 (51、52) を、近接することによりFRETを生じる蛍光発色団とした場合、ドナーとして作用する発色団 (仮に51とする) に励起波長を照射し、該発色団 (51) の蛍光強度を測定した場合、アンタゴニスト共存下では、非共存下 (つまり、既知のアゴニストのみ存在下) に比べて蛍光強度が増大する。逆に、二つの蛍光発色団のうち、ドナーとして作用する発色団 (仮に51とする) に励起波長を照射し、アクセプターとして作用する発色団 (この場合52) の蛍光強度を測定した場合には、アンタゴニスト共存下では、蛍光強度の低下が見られる。

#### 【0045】

以上のとおりのアゴニストのスクリーニング方法およびアンタゴニストのスクリーニング方法において、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を、アゴニスト、アゴニスト候補物質、アンタゴニスト候補物質等と共存させる方法は限定されず、様々な方法が考えられる。例えば、試料溶液中でアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) とアゴニスト候補物質、もしくは既知のアゴニスト/過剰量のアンタゴニスト候補物質を共存させる方法が挙げられる。このような方法では、アゴニストをin vitroで検出・定量、スクリーニングできる。

#### 【0046】

また、この出願の発明のスクリーニング方法では、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を組み込んだ発現ベクターを個々の培養細胞に導入する方法により、細胞内でアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) とアゴニスト候補物質やアンタゴニスト候補物質を共存させることができる。発現ベクターとしては、動物細胞発現用のプラスミドベクターが好ましく用いられる。このようなプラスミドベクターを細胞に導入する方法としては、電気穿孔法、リン酸化カルシウム法、リボソーム法、DEAEデキストラン法等の公知の方法を採用することができる。このように、アゴニスト・アンタゴニスト検

出用プローブ (1) を組み込んだ発現ベクターを細胞に導入する方法では、細胞をアゴニスト候補物質、既知のアゴニスト、アンタゴニスト候補物質等で刺激することにより、細胞を破壊することなく、アゴニストやアンタゴニストを *in vivo* でスクリーニングできる。

#### 【0047】

さらに、この出願の発明では、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、全細胞においてアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) が存在しているトランスジェニック非ヒト動物が得られる。トランスジェニック非ヒト動物は、公知の作成法 (例えば、非特許文献 31) に従って作製することができる。このようなトランスジェニック非ヒト動物は、すべての体細胞にアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) を保有しており、体内においてアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) と内在性のアゴニストを共存させることができる。また、このような非ヒト動物の体内に医薬品や内分泌攪乱物質などの検査物質や候補物質を導入することにより、体内で、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ (1) とアゴニスト候補物質やアンタゴニスト候補物質を共存させることができ、細胞および組織におけるシグナル変化を測定することにより、様々な物質のスクリーニングを行うことが可能となる上、医薬品、内分泌攪乱物質、あるいはこれらの候補物質による生命活動や疾患への影響や効果を調査することも可能となる。さらに、このようなトランスジェニック非ヒト動物を用いることにより、内在性アゴニストが分泌される時期や条件等の生体内動態を可視化分析することも可能となる。

#### 【0048】

なお、以上のとおりのスクリーニング方法において、スクリーニングの対象となるアゴニストやその候補物質は、天然物質であってもよいし、ゲニステイン (以下 Gen とする; 植物エストロゲン)、ジェチルスチルベストロール (以下 DES とする; スチルベン)、ビスフェノール A (以下 Bis-A とする; ニフェノール性物質)、ノニルフェノール (以下 NP とする; アルキルフェノール) 等の合成物質であってもよい。また、アンタゴニストやその候補物質は、4-hydroxytamoxifen (OHT)、ICI 182,780 などが例示されるが、これらに限定されない。

#### 【0049】

以下、実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

#### 【実施例】

#### 【0050】

##### <準備>

##### (1) 材料

Ham's F-12 培地、ウシ胎児血清 (FCS)、Hank's バランス電解液 (HBSS)、およびリポフェクタミン 2000 試薬は Life Technologies (Rockville, MD) より購入した。

#### 【0051】

ダルベッコ修飾イーグル培地 (DMEM)、トリプシン-EDTA、E2、DES、OHT、Gen は Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO) より購入した。

#### 【0052】

抗 GFP 抗体は Clontech (Palo Alto, CA) より入手した。

#### 【0053】

クローニング用酵素は全て Takara Biomedical (東京、日本) から入手した。

#### 【0054】

hER  $\alpha$  cDNA プラスミドは American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA) より購入した。

#### 【0055】

哺乳類発現ベクター pcDNA3.1(+) は Invitrogen Co. (Carlsbad, CA) より入手した。

## 【0056】

Bis-A、NP、ICI 182,780はWAKO Pure Chemicals Industries Ltd (大阪、日本) より入手した。

## 【0057】

その他の試薬は分析試薬グレード品を使用した。

## (2) プラスミド構築

標準的なポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により ECFP (配列番号 3) (1-238aa)、EYFP (配列番号 4) (1-238aa)、ヒトエストロゲンレセプター  $\alpha$  LBD (配列番号 5) (305-550aa) (以下、ER  $\alpha$  LBD とする)、屈曲性リンカー (配列番号 6)、およびステロイドレセプター活性化補助因子 1 NR ボックス II (配列番号 2) (687-697aa) のフラグメント cDNA を産生し、Kozak 配列と制限部位を連結して図 2 に示される構成を構築した。

## 【0058】

これより、ステロイドレセプター活性化補助因子 1 (SRC-1) の活性化補助因子ペプチド (配列番号 2) (非特許文献 23~25) が、短い可動性のリンカー (配列番号 3) を介して ER  $\alpha$  LBD に連結され、この融合蛋白質が 2 種類の異なる蛍光波長を有する蛍光蛋白質、すなわち CFP (ドナー) と YFP (アクセプター) に挟まれた、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを得た。

## 【0059】

なお、PCR フラグメントの配列は、ABI310 ジェネティック・アナライザーを用いて決定した。

## 【0060】

この cDNA を、哺乳類発現ベクター pcDNA3.1(+) の HindIII と XhoI 部位に挿入した。

## (3) 細胞培養と形質移入

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO-K1) 細胞を、10 % ウシ胎児血清 (FCS) を添加した Ham's F-12 培地培地、ならびに 10 % FCS、1.0 mM ビルビン酸ナトリウム、0.1 mM 非必須アミノ酸を添加したダルベッコ修飾イーグル培地中にて、それぞれ 5% CO<sub>2</sub> 下、37℃ で培養した。細胞の形質移入は、リポフェクタミン 2000 試薬の存在下、ガラス底シャーレ中で、プローブを含む発現ベクター pcDNA3.1(+) を用いて行った。

## 【0061】

細胞は、形質移入から 12~24 時間後に画像処理可能な状態となった。

## (4) 蛋白質発現のイムノブロット分析

図 2 に示される各プローブをエンコードしている発現ベクター pcDNA3.1(+) を用いて形質移入した CHO-K1 の細胞破砕液を、10 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動による SDS-PAGE に供し、電気泳動によりニトロセルロース膜上に転写した。

## 【0062】

この膜は、まず抗 GFP 抗体を用いて、続いてアルカリホスファターゼ標識抗ウサギ抗体を用いて可視化した。

## 【0063】

蛋白質の発現量は、イメージアナライザ (LAS-1000 plus, Fujifilm CO., 東京、日本) により定量した。

## (5) 細胞の画像処理

画像処理に先立ち、培地を Hank's バランス電解液に置き換えた。細胞の画像処理は Carl Zeiss Axiovert 135 顕微鏡上で、MetaFluor (Universal Imaging, West Chester, PA) でコントロールされた冷却電荷結合素子カメラ MicroMAX (Roper Scientific Inc, Tucson, AZ) を用いて、形質移入後 12~24 時間以内に室温条件で実施した。

## 【0064】

440±10 nm 励起時の露出時間は 100 ms であった。蛍光画像の取得は 40×油浸対物レンズ (Carl Zeiss, Jena, Germany) を用い、480±15 nm ならびに 535±12.5 nm のフィルターを介して行った。

<実施例 1> アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブの応答性評価



(1) エストロゲンの中で最も強力な活性を示すことで知られる $17\beta$  エストラジオール (E2) をアゴニストとし、アゴニスト刺激に対するプローブの応答性を評価した。

【0065】

まず、プローブ (図 2 a) を発現させた CHO-K1 細胞を 100 nM E2 で刺激し、FRET 変化の経時変化を観察した。図 3 に、E2 刺激前と刺激後の細胞画像を示した。なお、図 3 においては、480/535 nm の発光強度比が疑似カラー画像として示されている。

【0066】

図 3 より、100 nM E2 刺激による疑似カラーのブルーシフトが観察された。これは、CFP/YFP 発光強度比の減少 (FRET の増加) を表している。

【0067】

発光強度比の減少は、E2 添加後数秒以内に検出され、1000 秒以内にプラトーに達した (図 4 a)。一方、E2 を添加しないこと以外は同一条件で FRET 変化の経時変化を観察したところ、有意な変化は見られなかった (図 4 b)。

(2) 次に、このような FRET の増加が E2 によるリガンド認識部位 ( $ER\alpha$  LBD) と結合応答部位 (LXXLL モチーフ) の相互作用により引き起こされていることを確認するため、LXXLL モチーフの疎水性ロイシン (L) 残基を全てアラニン (A) 残基に置換した (配列番号 7) 変異プローブを作成した (図 2 b)。

【0068】

図 4 c に示されるように、変異プローブを発現させた CHO-K1 細胞では、E2 刺激による CFP/YFP 発光強度比の有意な変化は見られなかった。

【0069】

したがって、FRET の変化は、アゴニスト刺激の結果、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブにおけるリガンド認識部位 ( $ER\alpha$  LBD) に結合応答部位 (LXXLL モチーフ) が結合したことによるものであることが確認された。

【0070】

また、従来報告されているように (非特許文献 5、23~25)、 $ER\alpha$  LBD の活性化補助因子結合ドメインに対する相互作用に LXXLL モチーフの疎水性ロイシン残基が重要な役割を果たすことも確認された。

(3) 次に、E2/ $ER\alpha$  LBD 複合体の X 線結晶解析を行ったところ、E2 は  $ER\alpha$  LBD に存在する疎水性リガンド結合ポケット (容積  $450\text{\AA}^3$ ; E2 の分子容 ( $245\text{\AA}^3$ ) の約 2 倍) で包接されており、低エネルギー立体構造を取っていることが明らかになった (非特許文献 32)。

【0071】

ヘリックス 12 は、リガンド結合ポケットの上に位置し、これにより疎水性 LXXLL モチーフの取り込みと相互作用を可能とする疎水性の溝が形成されている。また、このような溝は、LXXLL モチーフの 3 つのロイシン残基の側鎖と  $ER\alpha$  LBD 側鎖の Met 543、Lys 362、Glu 542 残基との間に生じるファン・デル・ワールス接触により安定化されている (非特許文献 33)。

【0072】

これより、プローブにおけるリガンド認識部位 ( $ER\alpha$  LBD) と結合応答部位 (LXXLL モチーフ) の相互作用により、CFP と YFP が近接し、その結果 FRET が生じることが確認された。  
<実施例 2> アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを用いた外来性アゴニストのスクリーニング

CHO-K1 細胞内でプローブを発現させ、DES、Gen、Bis-A および NP の外来性エストロゲンについて、エストロゲン様活性の誘発能力を評価した。

【0073】

なお、物質の濃度は、 $1.0 \times 10^{-4}$  M から  $1.0 \times 10^{-11}$  M の範囲とした。

【0074】

図 5 に各物質の濃度と発光強度比変化の値の関係 (反応曲線) を示した。

【0075】

図 5 から、各物質の  $EC_{50}$  (リガンド認識部位 ( $ER\alpha$  LBD) と結合応答部位 (LXXLL モチーフ)

の反応が50 %起こるために必要な物質濃度) 値を求めたところ、E2、DES、Gen、NPおよび Bis-Aについて、各々 $0.8 \times 10^{-8}$  M、 $1.3 \times 10^{-8}$  M、 $6.5 \times 10^{-8}$  M、 $0.26 \times 10^{-6}$  M、 $0.42 \times 10^{-6}$  Mを得た。これらのEC<sub>50</sub>値を、相対取り込み能力(RRA; 非特許文献34)に変換し、各物質が結合応答部位のリガンド認識部位への取り込みを促進する相対的能力を比較した。

#### 【0076】

なお、RRAは以下の式により算出した。

#### 【0077】

$$RRA = (\text{E2濃度 [50 \%反応]} / \text{EDC濃度 [50 \%反応]}) \times 100$$

実施例1において使用したエストロゲンE2のRRA値は任意に100とした。E2、DES、Gen、NP、Bis-AのRRA値は各々100、60、12、3.0、1.9として得られた。

#### 【0078】

したがって、これらの物質が、結合応答部位のリガンド認識部位への取り込みを促進する能力は、 $E2 > DES > Gen > NP > Bis-A$  であることが明らかになった。

#### 【0079】

以上より、各物質のFRET応答の違いは、外来性アゴニストがプローブ内のER $\alpha$  LBDの立体構造をリガンド特異的に変化させ、LXXLLモチーフを取り込めるようにする「強さ」を反映していることが確認された。

#### 【0080】

E2はERに結合することにより、ERの三次構造における立体配座の変化を誘導する。このような立体配座の変化により、ERのリガンド結合ドメインは、活性化補助因子を取り込み、その結果として基本転写機構の構築を媒介するような位置に配置されるようになる(非特許文献4、5)。

#### 【0081】

しかし、実際の立体構造変化、すなわち外来性エストロゲンが誘導するERにおけるヘリックス12の再配置は、各物質の立体的および静電的性質の違いに影響され、E2の場合と異なる可能性がある(非特許文献24、25、35、36)

なお、Routledge et al.は、GSTプルダウンアッセイを用いて、前記の各物質について、ER(と活性化補助因子蛋白質の会合を促進する能力を求め、同様の結果を得ている(非特許文献34)。

<実施例3> アゴニストとアンタゴニストの識別

(1) プローブを発現させたCHO-K1細胞を、E2ならびにエストロゲンレセプターのアンタゴニストとして知られているICI 182,780およびOHT(それぞれ1.0  $\mu$ M)により刺激し、FRET応答の変化をモニターした。

#### 【0082】

E2刺激によりFRETの大幅な増大が見られた(図6a)が、ICI 182,780とOHTではFRETの顕著な増大は見られなかった(図6b、c)。

(2) 次に、E2が、リガンド認識部位に結合したICI 182,780およびOHTを置換する能力を検討した。

#### 【0083】

プローブを発現させたCHO-K1細胞を含む3つの異なるガラス底シャーレに、1.0  $\mu$ MのICI 182,780を添加し、室温で15分間インキュベートした。その後、ICI 182,780を洗浄除去することなく、1番目、2番目、3番目のシャーレにそれぞれ1.0  $\mu$ M、10  $\mu$ M、100  $\mu$ MのE2を添加し、FRET応答の変化をモニターした。

#### 【0084】

1.0  $\mu$ MのICI 182,780が存在する条件で、1.0  $\mu$ Mと10  $\mu$ MのE2を添加した場合には、FRETの変化は観察されなかったものの(図6d、e)、E2の濃度を100  $\mu$ Mとした場合にはFRETレベルの変化が見られた(図6f)。しかし、この変化は1.0  $\mu$ MのE2のみで生じるFRET変化の40 %ほどであった。

#### 【0085】

同様に、1.0  $\mu\text{M}$ のOHTが存在する条件で1.0  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ のE2を添加した場合には、FRET応答の増大は、それぞれ、1.0  $\mu\text{M}$ のE2単独で生じる変化の40 %、65 %、90 %であった(図6 g、h、i)。

#### 【0086】

以上結果から、E2 (アゴニスト) は、生細胞中でプローブにおけるリガンド認識部位 (ER  $\alpha$  LBD) と結合応答部位 (LXXLLモチーフ) の相互作用を促進するが、ICI 182,780とOHT (アンタゴニスト) はこのような相互作用を阻害することが確認された。さらに、相互作用のアンタゴニストによる阻害は、アゴニストの濃度を100倍高濃度にしても完全に回復しないことが示された。

#### 【0087】

したがって、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブがアゴニストの存在下で発信するシグナルが、アンタゴニストの共存により妨害されることが確認された。

(3) 以上の結果を、アゴニストとアンタゴニストが存在する状態でのER  $\alpha$  LBDのX線結晶解析結果(非特許文献32および33)と比較した。

#### 【0088】

アゴニストが結合した場合には、リガンド結合ドメインの立体構造変化が誘導され、同時にリガンド結合ポケット上にH12が配置されるため、リガンド結合ドメイン表面上にある活性化補助因子結合ドメインが曝露される。

#### 【0089】

一方、アンタゴニストは、塩基性の嵩高い側鎖とヘリックス12の間に直接的な立体効果を及ぼすことにより、ヘリックス12が適切な配座を取ることを阻害する。そのため、活性化補助因子結合ドメインが正しく形成されず、リガンド結合ドメイン(上記の実施例においては、ER  $\alpha$  LBD)が活性化補助因子の核内レセプター相互作用ドメイン(上記の実施例においては、LXXLLモチーフ)と相互作用できなくなる。

#### 【0090】

以上より、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブにおけるCFPからYFPへのエネルギー転移は、アゴニスト(E2)存在下では起こるが、アンタゴニスト(ICI 182,780とOHT)の存在下ではブロックされることが示された。

#### 【0091】

したがって、アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを用いて、各種の候補物質存在下におけるリガンド認識部位による結合応答部位の取り込み能を測定することにより、アゴニストとアンタゴニストを選択的に判別できることが確認された。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0092】

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、核内レセプターに対するアゴニストやアンタゴニストを選択的に検出、定量できるアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブが提供される。このようなアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブを用いることにより、特定の物質が、該核内レセプターに対するアゴニストとして作用するか、アンタゴニストとして作用するかを、迅速に、精度高く判定することが可能になる。したがって、内分泌攪乱物質や特定の疾患に対する医薬品の高性能スクリーニング方法が提供される。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0093】

【図1】この発明のアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブの構成および作用を例示した概略模式図である。

【図2】この発明の実施例において、作製されたアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブおよび変異プローブの構成を示した概略模式図である。(a: プローブ、b: 変異プローブ)

【図3】この発明の実施例において、プローブを発現させたCHO-K1細胞を100 nM E2で刺激した際のFRET変化の経時変化を示した細胞画像である。480/535 nmの発光強度比が疑似カラー画像として示されている。

【図 4】この発明の実施例において、プローブを発現させたCHO-K1細胞を100 nM E2で刺激した際のFRET変化の経時変化を示した図である。(a : E2添加後、b : E2未添加、c : 変異プローブを発現させたCHO-K1細胞のE2刺激)

【図 5】この発明の実施例において、CHO-K1細胞内でプローブを発現させ、DES、Gen、Bis-AおよびNPの外来性エストロゲン添加した際の濃度と発光強度比変化の値の関係(反応曲線)を示した図である。

【図 6】この発明の実施例において、プローブを発現させたCHO-K1細胞を、E2、ICI 182,780、およびOHT(それぞれ1.0  $\mu$ M)により刺激した際のFRET応答の変化を示した図である。(a : 1.0  $\mu$ M E2、b : 1.0  $\mu$ M ICI 182,780、c : 1.0  $\mu$ M OHT、d : 1.0  $\mu$ M ICI 182,780/1.0  $\mu$ M E2、e : 1.0  $\mu$ M ICI 182,780/10  $\mu$ M E2、f : 1.0  $\mu$ M ICI 182,780/100  $\mu$ M E2、g : 1.0  $\mu$ M OHT/1.0  $\mu$ M E2、h : 1.0  $\mu$ M OHT/10  $\mu$ M E2、i : 1.0  $\mu$ M OHT/100  $\mu$ M E2)

【符号の説明】

【0 0 9 4】

- A アゴニスト共存下
- B アンタゴニスト共存下
- 1 アゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブ
- 2 リガンド認識部位 (ER  $\alpha$  LBD)
- 3 結合応答部位 (SRC-1 NR boxII)
- 4 リンカー
- 51 マーカー部位 (CFP)
- 52 マーカー部位 (YFP)
- 61 アゴニスト
- 62 アンタゴニスト
- 71 リンカー
- 72 リンカー

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> Probe for detection of nuclear receptor agonist/antagonist and method for screening agonist and antagonist using the same

<130> NP03500-SH

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> any amino acid

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(3)

<223> any amino acid

<400> 1

Leu Xaa Xaa Leu Leu  
1 5

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<300>

<308> GeneBank/NP\_671766

<309> 2003-12-22

<313> (687)..(697)

<400> 2

His Lys Ile Leu His Arg Leu Leu Gln Glu Gly  
1 5 10

<210> 3  
<211> 239  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthesized polypeptide

<300>  
<308> GeneBank/GAG11884  
<309> 2003-05-21  
<313> (1)..(238)

<400> 3

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu  
1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly  
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile  
35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr  
50 55 60

Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys  
65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu  
85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu  
100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly  
115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr  
130 135 140

Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn  
145 150 155 160

Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser  
165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly  
180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu  
195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe  
210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys  
225 230 235

<210> 4  
<211> 248  
<212> PRT  
<213> unknown

<220>  
<223> Artificial Sequence

<300>  
<308> GeneBank/AAQ93355  
<309> 2003-10-12  
<313> (1)..(238)

<400> 4

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu  
1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly  
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile  
35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr  
50 55 60

Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys  
65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu  
85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu  
100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly  
115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr  
130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn  
145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser  
165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly  
180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu  
195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe  
210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Ser  
225 230 235 240



Gly Leu Arg Ser Thr Gly Ser Arg  
245

<210> 5

<211> 246

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> part of a eucaryotic protein

<300>

<308> GeneBank/NP\_036821

<309> 2004-01-23

<313> (305)..(550)

<400> 5

His Thr Lys Lys Asn Ser Pro Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met  
1 5 10 15

Val Ser Ala Leu Leu Asp Ala Glu Pro Pro Leu Ile Tyr Ser Glu Tyr  
20 25 30

Asp Pro Ser Arg Pro Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr  
35 40 45

Asn Leu Ala Asp Arg Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg  
50 55 60

Val Pro Gly Phe Gly Asp Leu Asn Leu His Asp Gln Val His Leu Leu  
65 70 75 80

Glu Cys Ala Trp Leu Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser  
85 90 95

Met Glu His Pro Gly Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp  
100 105 110

Arg Asn Gln Gly Lys Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met  
115 120 125

Leu Leu Ala Thr Ser Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu  
130 135 140

Glu Phe Val Cys Leu Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr  
145 150 155 160

Thr Phe Leu Ser Ser Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile  
165 170 175

His Arg Val Leu Asp Lys Ile Asn Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala  
180 185 190

Lys Ala Gly Leu Thr Leu Gln Gln Gln His Arg Arg Leu Ala Gln Leu  
195 200 205

Leu Leu Ile Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu  
210 215 220

His Leu Tyr Asn Met Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu  
225 230 235 240

Leu Leu Glu Met Leu Asp  
245

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> synthesized oligopeptide

<400> 6

Gly Gly Asn Gly Gly  
1 5

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

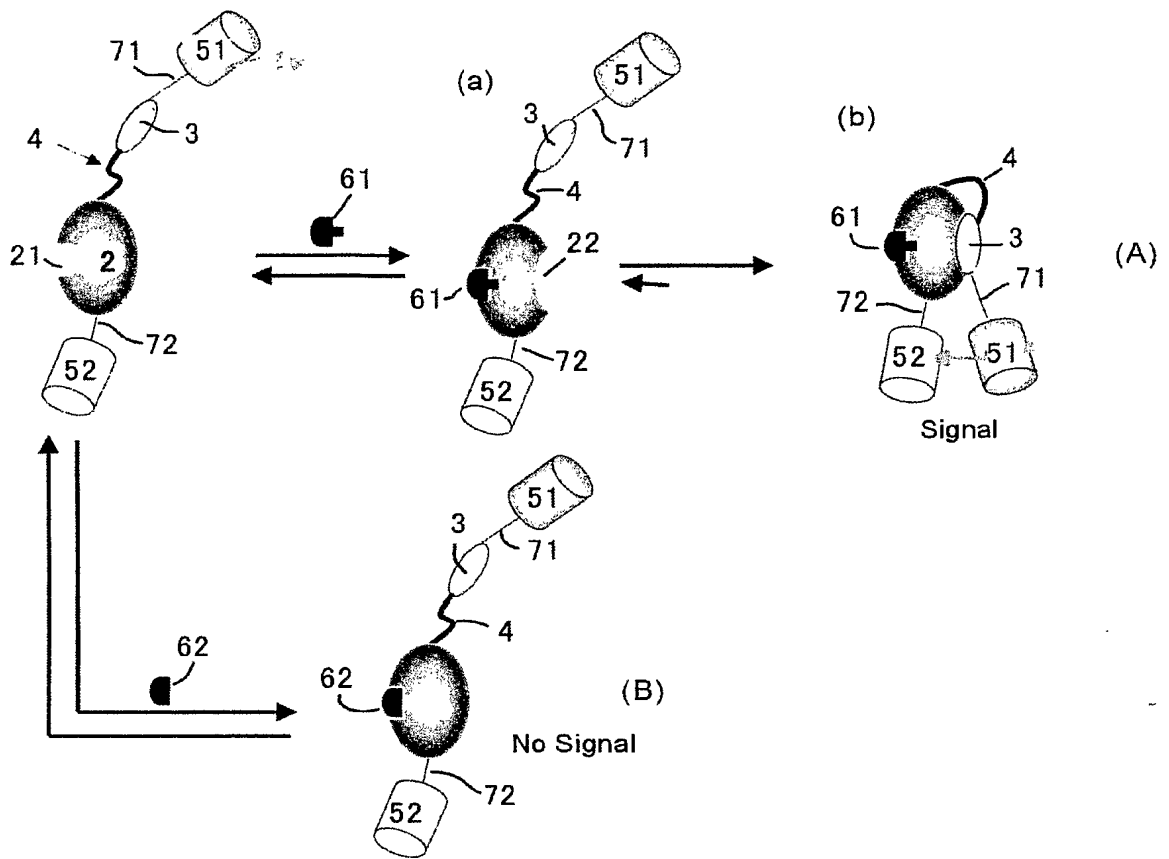
<223> synthesized oligopeptide

<400> 7

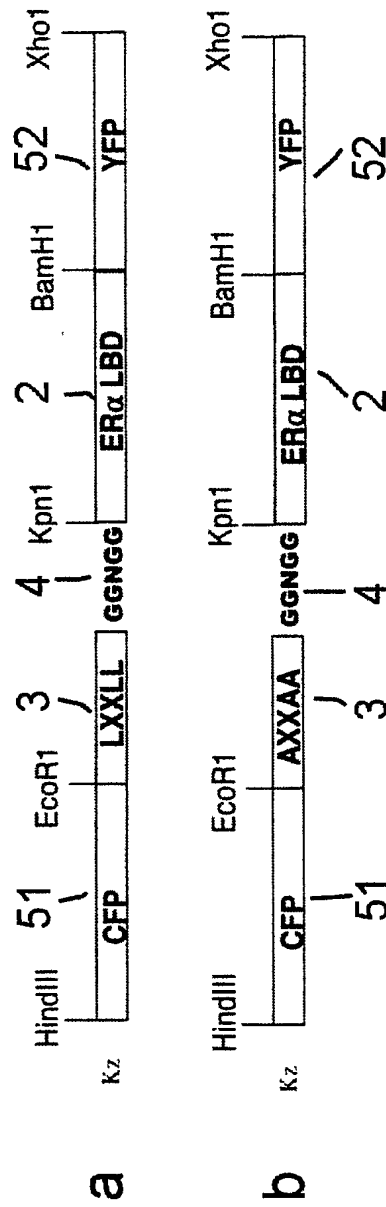
His	Lys	Ile	Ala	His	Arg	Ala	Ala	Gln	Glu	Gly
1				5				10		

【書類名】 図面

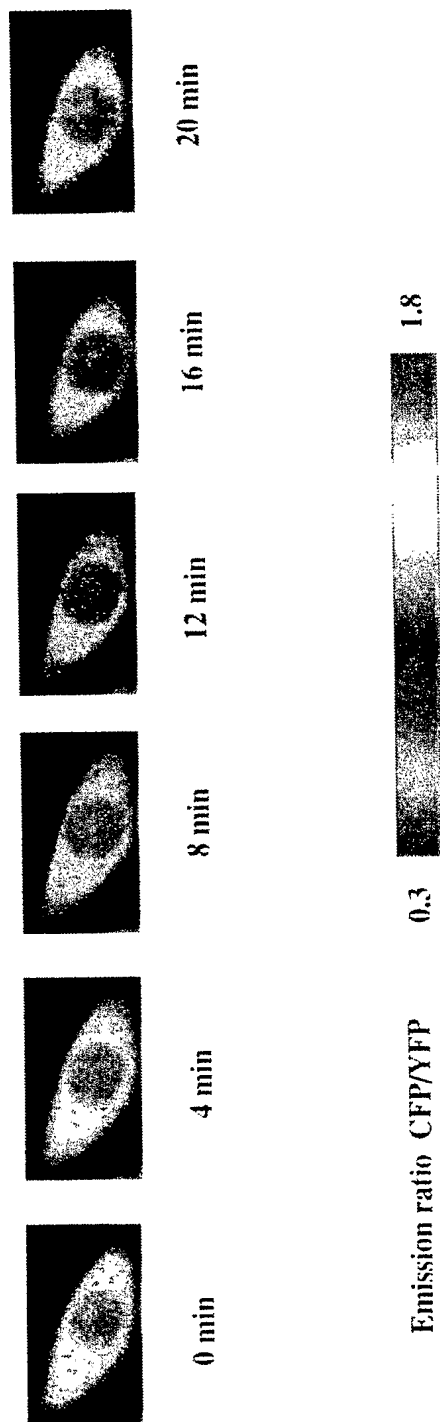
【図 1】



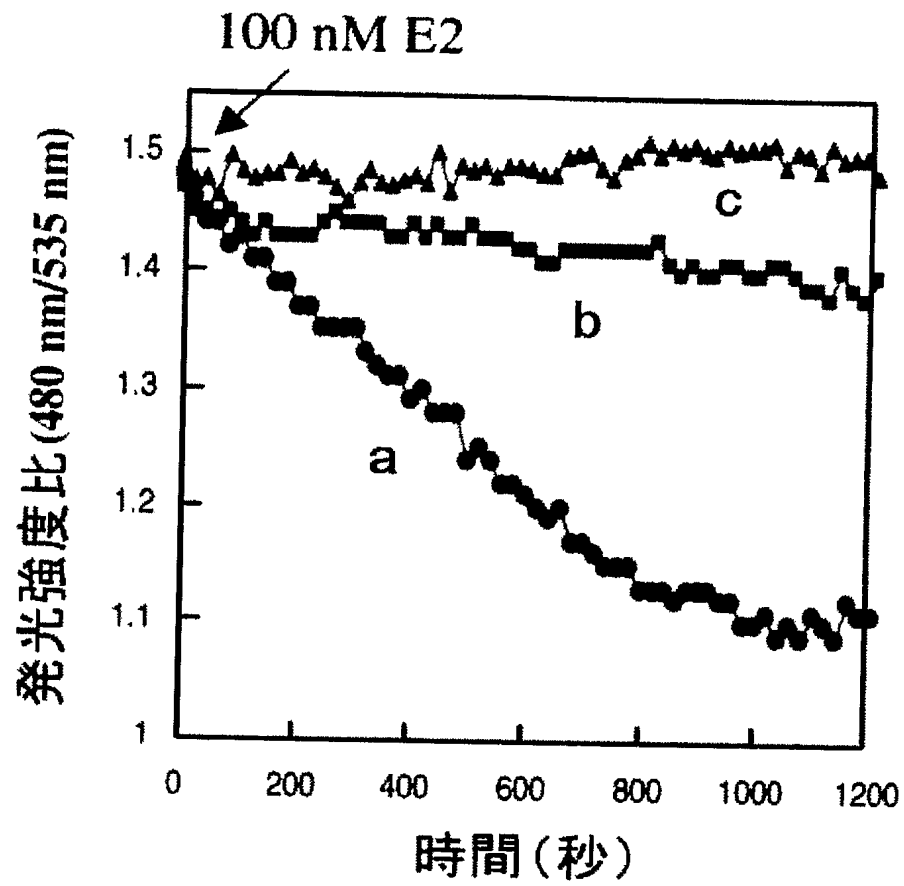
【図 2】



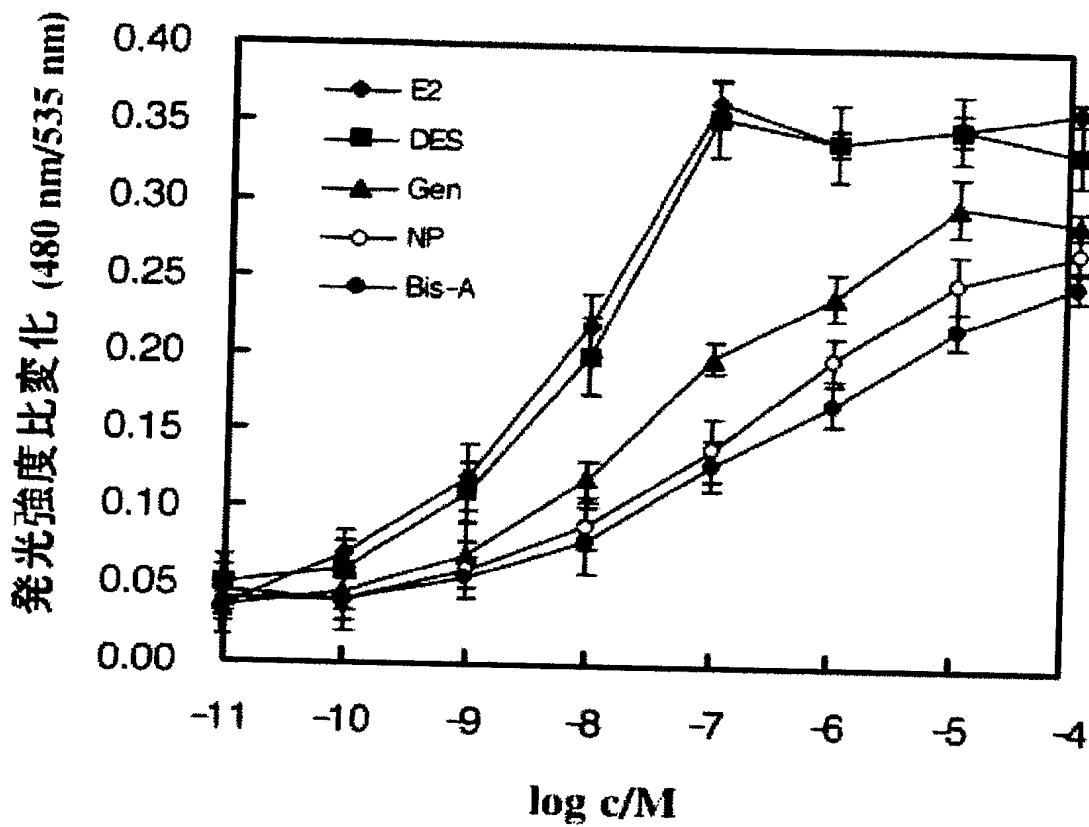
【図 3】



【図 4】

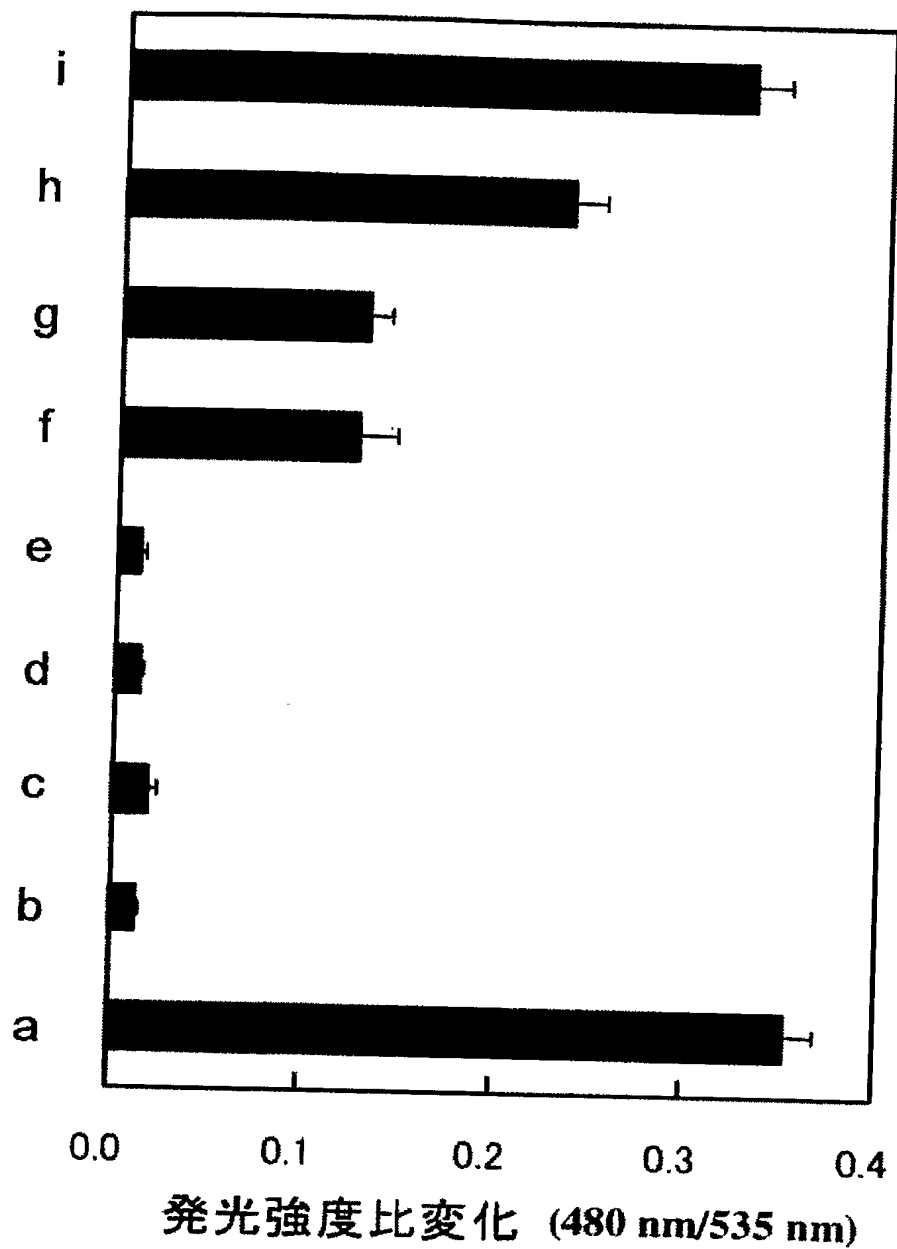


【図 5】





【図 6】



## 【書類名】 要約書

## 【要約】

## 【課題】

従来技術の問題点を解消し、核内レセプターに対するアゴニストやアンタゴニストを高選択的にスクリーニングするための簡便で精度高い方法を提供する。

【解決手段】 少なくとも、核内レセプターのリガンド結合ドメインを含むリガンド認識部位と、該核内レセプターリガンド結合ドメインにおける活性化補助因子結合ドメインに特異的に結合するペプチド鎖を含む結合応答部位が、屈曲性のリンカーを介して連結されており、この「リガンド認識部位／リンカー／結合応答部位」融合構造の両末端に、互いの接近が検出可能な二つのマーカー部位が各々連結されていることを特徴とする核内レセプターのアゴニスト・アンタゴニスト検出用プローブとする。

## 【選択図】 図 1

特願 2 0 0 4 - 0 3 5 6 7 8

ページ : 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 0 3 3 6 0 1 1 5 ]

1. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号  
氏 名 独立行政法人 科学技術振興機構
2. 変更年月日 2 0 0 4 年 4 月 1 日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号  
氏 名 独立行政法人科学技術振興機構